

STRÖM, Clin. chim. Acta 4, 197 (1959). — 7. VAN HANDEL, E. und D. B. ZIVERSMIT, J. Lab. clin. Med. 50, 152 (1957). — 8. RANDRUP, A., Scand. J. clin. Lab. Invest. 12, 1 (1960). — 9. EGGSTEIN, M., Klin. Wschr. 43, 1031 (1965). — 10. ALBRINK, M. J., J. Lipid Res. 1, 53 (1959). — 11. FRAZER, A. C. und H. C. STEWART, J. Physiol. 95, 21 (1939). — 12. ZÖLLNER, N. und K. KIRSCH, Zschr. ges. exp. Med. 135, 545 (1962). — 13. LÖHR, H., J. STUMM und H. WOLF, Med. Ernähr. 6, 8 (1965). — 14. WIELAND, O., Biochem. Z. 329, 313 (1957). — 15. HAGEN, J. H. und P. B. HAGEN, Canad. J. Biochem. Physiol. 40, 1129 (1962). — 16.

KREUTZ, F. H., Klin. Wschr. 40, 362 (1962). — 17. KREUTZ, F. H. 5. Intern. Congress of Clinical Chemistry, Detroit 1963. — 18. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, Klin. Wschr. 44, 262 (1966). — 19. GARLAND, P. B. und P. J. RANDLE, Nature (London) 196, 987 (1962). — 20. EGGSTEIN, M., Klin. Wschr. 44, 267 (1966). — 21. MELICHAR, V. und H. WOLF, Biol. Neonat. (Basel) 11, 50 (1967). — 22. NOVAK, M., V. MELICHAR und Biol. Neonat. (Basel) 8, 253 (1965). — 23. PERSSON, B. und J. GENTZ, Acta paediatr. (Uppsala) 55, 353 (1966). — 24. SCHUSTER, M., Dissert. Göttingen (1963).

Prof. Dr. H. Wolf

34 Göttingen, Humboldtallee 38

Serumextraktion und dünnschichtchromatographische Trennung zirkulierender Jodaminosäuren

Vergleich der Ergebnisse durch chemische und nucleonische Nachweismethoden

Von E. ZAPPI und G. HOPPE

Aus der 1. Medizinischen Abteilung (Chefarzt: Prof. Dr. K. H. Pfeffer) und der Strahlenabteilung (Chefarzt: Prof. Dr. W. Fromhold) des Städt. Auguste-Viktoria Krankenhauses, Berlin

(Eingegangen am 19. Oktober 1966)

Es wird ein kombiniertes Verfahren beschrieben, das durch alkoholische Extraktion aus dem Serum und durch dünnschichtchromatographische Trennung die chemische Identifikation verschiedener zirkulierender Jodaminosäuren, angeblich Jodtyrosine, gestattet. Die gleichzeitige Anwendung von Radiojod erlaubt aber den Nachweis markierter Jodthyronine in den gleichen Chromatogrammen, die chemisch nicht zu erfassen sind. Nach der Diskussion der Ergebnisse wird auf die Nutzbarkeit der Methode hingewiesen, klinisch-pathologische Aspekte zu untersuchen.

A method is described for the chemical identification of different circulating iodo-amino acids, presumably iodo-tyrosines; alcoholic extraction of the serum is followed by thin layer chromatography. If radioactive iodine is also used, labelled iodothyronines, which cannot be detected chemically, can then be detected on the same chromatograms. The results are discussed, and the suitability of the method for the study of clinical-pathological problems is indicated.

Die geringen Serumkonzentrationen des Thyroxin und anderen jodierter phenolischer Aminosäuren („JPA“) erschweren den Nachweis und die Identifizierung dieser Verbindungen. Sie wurde bisher am häufigsten versucht durch Anwendung von Radiojod. Die Verwendung radioaktiven Jods hat aber, abgesehen von den Einwänden die gegen seine Anwendung in hohen Dosen beim Menschen bestehen, methodische Fehlermöglichkeiten. So bleibt z. B. seit den ersten Markierungsversuchen der Schilddrüsenhormone in den fünfziger Jahren die Frage offen, ob die dargestellten Substanzen nicht teilweise Artefakte sind. Diese könnten durch die Bestrahlung der Schilddrüse oder während langdauernder chromatographischer Verfahren nachträglich durch die ionisierenden Strahlen entstanden sein (1—6). Die Jodaufnahme der Schilddrüse und der Einbau des Radiojods in die verschiedenen organischen Fraktionen sind direkt abhängig von dem biologischen Zustand des Parenchyms der Drüse. Die Markierungsrate der JPA ist unterschiedlich und darum eine qualitative oder gar quantitative Aussagemöglichkeit dieser Methoden sehr begrenzt. Die ersten indirekten chemischen Aussagen über die Natur der im Plasma zirkulierenden Jodverbindungen zeigten eine nahezu gleichmäßige Aufteilung in Jodthyronine und Jodtyrosine (7). Spätere Untersuchungen,

die schon mit Radiojod durchgeführt wurden, erbrachten dagegen übereinstimmend den fast ausschließlichen Nachweis von Thyroxin. Später wurden auch Trijodthyronin im Serum nachgewiesen und in den letzten Jahren mit zunehmender Häufigkeit Dijod- und Monojodtyrosin (8—12). Die Anwesenheit dieser Substanzen wurde jedoch meist als eine Besonderheit von diagnostischem Wert für verschiedene Schilddrüsenerkrankungen betrachtet. So wurde der Nachweis von Trijodthyronin als ein Zeichen für Hyperthyreose angesehen (13, 14). STANSBURY begründete ebenfalls die Diagnose der Jodfehlverwertung bei bestimmten Fällen der Hypothyreose mit dem Vorhandensein von jodierten Tyrosinen im Serum (15, 16). Einige Autoren waren aber der Ansicht, daß diese Substanzen normale Komponenten des Plasmas wären, die aus verschiedenen Gründen (unterschiedliches „turn over“, unterschiedliche Verdünnung der Substanzen in ihren entsprechenden „pools“, geringerer Jodanteil der Moleküle usw.) nur schwer oder überhaupt nicht mit Radiojod markiert werden könnten (17, 18).

WERNER und BLOCK führten 1959 vergleichende Untersuchungen durch, wobei die JPA chemisch und durch Radioaktivität bestimmt wurden. Sie konnten dabei zum ersten Male eine auffällige Diskrepanz zwischen den

Aussagen beider Methoden beschreiben. Sie stellten bei chemischen Bestimmungen fest, daß zwischen einem Drittel und der Hälfte des Serumjods an Jodtyrosine gebunden war, während bei denselben Seren durch Markierungsmethoden diese Substanzen praktisch nicht nachweisbar waren. Die Thyronine, die nicht ganz die Hälfte des organischen Jods banden, speicherten aber 90% der Radioaktivität. Sie hielten deswegen die letztere Methode für völlig unzureichend, um eine korrekte Darstellung der JPA zu erreichen (19, 20). Die Bemühungen, neue analytische Methoden zu schaffen, die eine schnelle und zuverlässige Identifizierung der im Blut zirkulierenden JPA gestatten, sind also völlig berechtigt. Die Dünnschichtchromatographie („DC“) bietet bei der Kombination inaktiver Schichten mit schwach sauren Fließmitteln, die geringe Anteile organischer Lösungsmittel enthalten, die Möglichkeit zur scharfen Trennung verschiedener JPA (21, 22). Eine praktische Anwendbarkeit dieser DC-Systeme setzt aber die Existenz ausreichend gereinigter Serumextrakte voraus. Das Serum kann durch eine Reihe von Lösungsmitteln von den Störsubstanzen befreit werden (23).

Methodik

Es wurden drei Gruppen menschlicher Seren den jeweils beschriebenen Methoden unterworfen. In der 1. Untersuchungsreihe wurden Serenmuster (zu je etwa 25 ml) von 25 nicht an endokrinen Krankheiten leidenden Patienten verwandt, daneben 20 Serenmischungen zu 25 ml von je zwei bis drei Patienten aus dem allgemeinen Krankengut. — In der 2. Reihe wurde die gleiche Menge Serum von 20 nicht ausgewählten Patienten untersucht, die eine ^{131}J Dosis von 20–50 μC zwei Tage zuvor im Rahmen der Schilddrüsendiagnostik erhalten hatten. — Die 3. Gruppe umfaßt zehn Patienten, die eine Woche zuvor therapeutische Dosen von 2–10 mC ^{131}J erhalten hatten. Die Patienten mit einer diagnostischen Tracerdosierung stellten eine willkürliche Auswahl aus dem Krankengut der Strahlenabteilung dar. Unter ihnen befanden sich Euthyreote mit und ohne Struma sowie Hyper- und Hypothyreosen. Unter den Therapiepatienten überwogen die Hyperthyreosen. Außer der allgemeinen chemischen Entwicklung der erhaltenen Chromatogramme mit einem Jodreagenz erfolgte bei den markierten Seren eine fraktionierte Messung der Radioaktivität. In einer zusätzlichen Untersuchung wurden bei anderen Chromatogrammen zwecks Aufklärung der chemischen Natur der dargestellten Flecke Vergleichsfärbungen mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt. Hier wurden 5 Serummischungen von 100 ml aufbereitet.

Extraktionsverfahren

Nach Gerinnung von höchstens 50 ml Blut und Zentrifugation werden die gewonnenen etwa 25 ml Serum in eine 250 ml Zentrifugenflasche mit Schliff überführt und mit 0,25 ml konz. Essigsäure auf pH < 6 eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml 0,1M Propylthiouracil und 100 ml Methanol wird 10 Min. am Rückflußkühler im Wasserbad gekocht. Nach Trennung durch Zentrifugieren wird der Überstand in einen 250 ml Rundkolben überführt und der Eiweißniederschlag mit 30 ml Diäthyläther im Schüttelgestell 5 Min. re-extrahiert. Nach erneutem Zentrifugieren wird der zweite Überstand mit dem ersten vereinigt. Der Extrakt wird nach Zugabe von 15 g Na_2SO_4 und einer Spatelspitze Aktivkohle 5 Min. geschüttelt und wieder zentrifugiert. Der klare, farblose Extrakt wird in einem 250 ml Rundkolben mit Schliff mit einigen Glasperlen am Rotationsverdampfer bei Temperaturen unter 60° bis fast zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wird zweimal mit 3 ml 0,1N NaOH und einmal mit 3 ml dest. Wasser aufgenommen. Diese drei wäßr. Fraktionen werden in einem 60 ml Zentrifugenglas (Schliff) vereinigt und dann durch 5 Min. Schütteln mit 40 ml Petroläther ex-

trahiert und zentrifugiert. Man saugt die obere Schicht ab, der Rest des Petroläthers wird im Vakuum abgedampft. Nach Überprüfung des pH > 10 wird mit 5 ml Chloroform eine 2. Extraktion der wäßr. Phase mittels Schütteln und Zentrifugieren durchgeführt. Nach Absaugen des Chloroforms gibt man 1 ml 2N Essigsäure hinzu und führt eine 3., diesmal saure Extraktion mit 4 ml Chloroform durch. Nach Zentrifugieren wird das Chloroform verworfen und der Rest aus der wäßr. Phase abgedampft.

Die verbleibende wäßr. Phase wird nach Kontrolle des pH < 6 durch 10 Min. Schütteln mit 6 ml redestilliertem n-Butanol extrahiert und durch Zentrifugation getrennt. Die überstehende butanolische Phase wird sorgfältig abgesaugt und in ein 25 ml Zentrifugenglas mit Schliff gebracht. Die wäßr. Phase wird noch zweimal mit 5 und 4 ml n-Butanol in derselben Weise extrahiert. Die im Zentrifugenglas vereinigten alkoholischen Phasen werden mit 5 ml dest. Wasser gereinigt. Das Wasser wird nach der Trennung verworfen. Der Butanolextrakt wird mit etwas Na_2SO_4 und Aktivkohle getrocknet, zentrifugiert und nach Überführung in ein Zentrifugenglas mit Vakuumaufsatz bei 60° bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 0,2 ml eines Gemisches von Methanol-6N Ammoniak 9:1 aufgenommen und auf die DC-Platte aufgetragen.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden 20 × 20 cm Glasplatten benutzt, die mittels eines Desaga-Streichgerätes mit einer breiigen Suspension aus Cellulosepulver mit Gipszusatz (MN 300 G der Fa. Macheray, Nagel & Co) beschichtet wurden (25 g MN 300 G mit 150 ml Wasser für 5 Platten). Nach Auftragen des Extraktes und daneben 10 μl einer wäßr. Mischung der Standardsubstanzen (je 0,25 μg von 3,3', 5,5'-Tetrajod-DL-Thyronin („ T_4 “); 3,3', 5-Trijod-DL-Thyronin („ T_3 “); 3,5-Dijod-DL-Thyronin („ T_2 “); 3,5-Dijod-L-Tyrosin („DIT“) und 3-Monojod-L-Tyrosin („MIT“)) auf einer Ecke der Platte, wurde diese einer zweidimensionalen, aufsteigenden Chromatographie unterworfen. Im Verlauf des 1. Verfahrens wurden nur die in dem Auftragsfleck verbliebenen Lipide aus dem chromatographischen Feld entfernt. Dafür wurde reines Chloroform als 1. Fließmittel benutzt. Die jodierten phenolischen Aminosäuren wandern darin praktisch nicht. Nach Beendigung des 1. Verfahrens und nach Abdampfung des Chloroforms wurde die eigentliche Trennung der JPA in der 2. Richtung vorgenommen. Hierbei liefen Extrakt und Testsubstanzen miteinander parallel. Als 2. Fließmittel wurde Aceton-0,5N Essigsäure 2:8 gewählt, in dem die JPA mit deutlich unterschiedlichen R_F wanderten: MIT = 0,84; DIT = 0,71; T_2 = 0,53; T_3 = 0,18 und T_4 = 0,06. Die Platten wurden im Brutschrank bei 80° getrocknet und mit FFCA-Reagenz besprüht, unmittelbar photographiert und die Flecke manuell auf Papier durchgepaust. Nachher erfolgten die Radioaktivitätsmessungen.

Bei den durchgeführten Vergleichsuntersuchungen wurde jeder der angewandten 100 ml-Serumextrakte auf drei Auftragspunkte einer Platte verteilt, wobei zwei Flecke die fünffache Menge des dritten erhielten. Nach der zweidimensionalen Trennung wurde das Chromatogramm mit der geringen Konzentration mit FFCA-Reagenz, die beiden anderen mit Ninhydrin oder Pauly's Reagenz entwickelt.

Farbreagenzien

Als chemische Nachweismethoden wurden folgende Farbreagenzien verwendet:

FFCA-Reagenz (für Jodid und jodierte Verbindungen) nach GMELIN und VIRTANEN (24): Unmittelbar vor dem Gebrauch werden die Lösungen A, B und C im Verhältnis 5:5:1 gemischt und die DC-Platte damit besprüht.

Lösung A: 2,7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml 2N HCl

Lösung B: 3,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 100 ml dest. Wasser

Lösung C: 5 g AsO_2Na in 30 ml 1N NaOH und mit 65 ml 2N HCl unter Rühren bei 0° versetzt.

Als nützliche Modifikation der Methode erwies sich die zusätzliche Besprühung der Platten mit einer 2-proz. Natriumcarbonat-Lösung, die eine zunehmende Ausdehnung der dargestellten Flecke und

ebenfalls die Färbung des Hintergrundes zeitweise verhindert. Bei der Anwendung des FFCA-Reagenz kann man auf der DC-Platte ohne Schwierigkeiten $0,1 \mu\text{g}$ der hier geprüften Aminosäuren nachweisen.

Ninhydrin-Reagenz (für Aminosäuren)

Pauly's Reagenz (für phenolische Gruppen)

Die Ansetzung und Anwendung beider Reagenzien erfolgte in der bekannten Form (25, 26).

Bohrlochmessungen (diagnostische Seren)

Im Anschluß an die chemische Entwicklung wurde die chromatographische Schicht fraktioniert abgekratzt und quantitativ in Meßgläser überführt. Die Fraktionierung der Laufstrecke erfolgte in Koordination zu den durch die Färbung nachgewiesenen Testsubstanzen. Dabei wurde grundsätzlich der ganze Streifen in sechs geometrisch ungleichgroße Fraktionen unterteilt: T_4 , T_3 , inter T_3 — T_2 , DIT und MIT. Traten auf den Chromatogrammen Flecke auf, die dieser Verteilung nicht entsprachen, so wurden diese getrennt gemessen und es entstand eine höhere Fraktionszahl als 6. Die Meßzeit betrug 10 Min. Als Nullwert galt ein mitgemessener Schichtbereich mittlerer Größe, über den in beiden Richtungen zwar die Lösungsmittel, aber nicht der Extrakt gelaufen war.

Autoradiogramme (therapeutische Seren)

Die Platten mit therapeutischen Dosen von ^{131}J wurden 2 Tage auf folienlosen Röntgenfilm („SinoFilm“) in direktem gepreßten Kontakt belichtet.

Ergebnisse

Farbreaktionen

Aus der reproduzierbaren Konstanz, der scharfen Begrenzung und der Farbhomogenität der meisten erhaltenen Flecke läßt sich schließen, daß in ihnen weitgehend gereinigte Substanzen enthalten sind. Aufgrund ihrer erheblichen Größe bei der Beladung des Systems ist ein genauer Vergleich der R_F -Werte dieser Fraktionen mit den Standardsubstanzen manchmal nicht möglich. Bei der Besprechung der bisherigen mit den Farbreaktionen gewonnenen Ergebnisse wird auf chemisch präzise Definitionen noch verzichtet und nur von der topographischen Lage der dargestellten Flecke ausgegangen: Das chromatographische Feld wurde zweckmäßig in drei Zonen eingeteilt: in der 1., der Auftragslinie nahen Zone treten T_4 und T_3 auf (Jodthyronine-Zone), in der anderen, der Fließmittel nahen Zone finden sich MIT und DIT sowie T_2 (Jodtyrosine-Zone). Beide Zonen sind durch eine Zwischenstrecke geteilt, in der inkonstante Fraktionen auftreten.

Die chemischen Ergebnisse lassen sich nur schwer quantitativ erfassen. Als orientierende Aussage kann der Vergleich zwischen den unbekannten Flecken mit den Testflecken, die jeweils $0,25 \mu\text{g}$ Testsubstanz enthalten, dienen.

FFCA-Reagenz

Die Anwendung dieses Jodreagenz als Entwicklungsmittel führt bei den Chromatogrammen der 1. Gruppe von euthyreoten Patienten und Serenmischungen zu ganz ähnlichen Ergebnissen: Es tauchen ständig mindestens zwei und in 40% der Fälle drei scharf begrenzte, nicht gestreckte und intensiv gefärbte Flecke auf, die in der Zone der Jodtyrosine liegen. In der Zone der Jodthyronine kommt dabei nur in 5% ein flauer Fleck zur Anfärbung, der dem T_4 entspricht (Abb. 1).

Bei den Chromatogrammen der 2. Gruppe von Patienten, die eine tracer-Dosis erhalten hatten und bei denen zumindest an eine Schilddrüsenerkrankung gedacht wurde, kamen in der Zone der Jodtyrosine nur noch bei 10% zwei Flecke zur Ausbildung. 90% hatten drei bis fünf getrennte Fraktionen in dieser Zone und dazu in 60% der Fälle ein oder zwei Flecke in der Zone der Jodthyronine, gelegentlich auch ein oder zwei Flecke in der Zwischenzone (Abb. 1). Die Chromatogramme der mit Radiojod behandelten Patienten (3. Gruppe) unterscheiden sich weder in der Jodthyronin- noch in der Jodtyrosinverteilung von den oben besprochenen.



Abb. 1

Dünnschichtchromatogramme nach Entwicklung mit FFCA-Reagenz

Links: Jeweils $0,25 \mu\text{g}$ Testsubstanz (von der Startlinie zur Fließmittelfront T_4 , T_3 , T_2 , DIT und MIT). Rechts: Serumextrakte von Patienten, bei denen ein diagnostischer Radiojodtest durchgeführt wurde (Ausgangsmenge 25 ml Serum)

Vergleichsfärbungen

Bei den hier angewandten fünf Serenmischungen entwickelten sich mit dem FFCA-Reagenz zwei Flecke in der Zone der Jodtyrosine, die auch bei Pauly's- und dem Ninhydrinreagenz positiv waren. Das heißt, daß sich die Substanzen wie jodierte, phenolische Aminosäuren, wahrscheinlich Jodtyrosine, verhalten.

Radioaktivitätsmessung

Bohrlochmessung

Nach der fraktionierten Messung wurden fünf Chromatogramme von weiteren Berechnungen wegen unzureichender Radioaktivität ausgeschlossen. Bei den anderen fünfzehn wurden die Impulse prozentual berechnet und in der Tabelle 1 dargestellt. Aus ihr geht hervor, daß sich die Aktivität entweder gleichmäßig über alle Fraktionen verteilt oder vorwiegend in der T_4 - T_3 -Zone anreichert.

Autoradiogramme

Die Ergebnisse der Autoradiogramme sind in der Abbildung 2 teilweise dargestellt. Der größte Anteil der Radioaktivität findet sich in der T_4 - T_3 -Zone. Hier kommen in fast allen zehn untersuchten Chromatogrammen zwei starke Schwärzungen (stets eine Schwärzung in der T_4 -Zone) zur Darstellung, deren R_F mit den Standardsubstanzen eng übereinstimmt. In den anderen Zonen treten auch häufig, aber nicht ständig, einzelne Flecke auf, die in der Regel den chemisch dargestellten in der Form entsprechen.

Tab. 1

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen von Patienten, die 20–50 μC ^{131}I erhalten hatten. Die linke Spalte zeigt die Verteilung der Testsubstanzen mit ihren R_F -Werten, nach denen die Fraktionierung durchgeführt wurde. Chemisch nachgewiesene, zusätzliche Fraktionen sind auf den Trennlinien vermerkt

Test-Substanzen	Chromatogramme													
	8		13	19	1	7		2		3		12		3 12
MIT (0,84)	6	0	11	5	2	0	2	3	3	2	8	12	3	4 0
	14	17	6				7					8		6
DIT (0,71)	3	17	11	11	1	4	0	3	2	5	0	0	11	5 0
	17	10								0	2			14
T ₂ (0,53)	11	11	11	19	2	7	0	6	2	5	0	10	2	0 4
	6	10	14	12	0	3	4	4	0	2	0	0	3	18 4
T ₃ (0,18)	16	15	5	11	10	10	5	6	8	8	15	11	10	6 21
T ₄ (0,08)	18	20	30	22	84	69	81	78	83	79	75	60	71	43 50

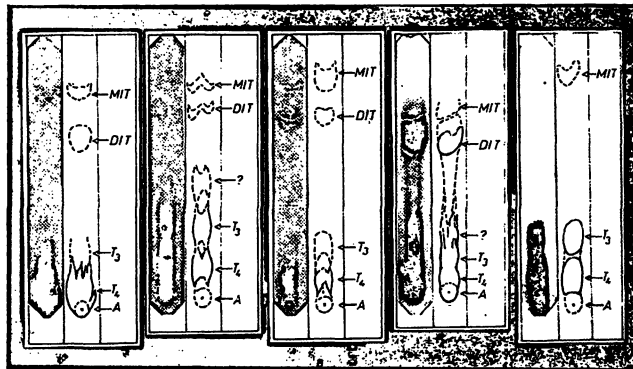


Abb. 2

Autoradiogramme von Dünnschichtplatten. Zweitägige Belichtungszeit auf Sinofilm bei therapeutischen Radiojoddosen von 2–10 mC. Die Zuordnung wurde nach den mitgelaufenen Testsubstanzen durchgeführt

Diskussion

Die Anwendung von FFCA-Reagenz führt bei Chromatogrammen euthyreoter Patienten und bei Serenmischungen zu ähnlichen Ergebnissen. Man findet in allen Fällen mindestens zwei starke Flecke, die sich nach dem Verteilungskoeffizienten, chromatographischen Verhalten und Färbungseigenschaften als jodierte Tyrosine ansprechen lassen. Ob dem Auftreten weiterer Flecke in der Zone der Jodthrosine oder in der Zone von T₄-T₃ ein diagnostischer Wert zukommt, muß noch untersucht werden. Die Möglichkeit überhaupt eine chemische Darstellung jodierter Substanzen auf Chromatogrammen zu erreichen, ist beachtlich, wenngleich der ständige Nachweis von jodierten Tyrosinen in Abwesenheit von Jodthyroninen im Widerspruch mit den allgemeinen Ergebnissen der Papierchromatographie steht.

Daß die dargestellten Flecke Artefakte sind, ist nach den durchgeführten Kontrollen sehr unwahrscheinlich. Die konstante Reproduzierbarkeit einiger Flecke auf dem Chromatogramm spricht auch dagegen. Die Artefakte entstehen bekanntlich unter kritischen pH- und Temperaturbedingungen, die bei dieser Methode vermieden wurden (27–31). Hier muß auch auf die schützende Wirkung des angewandten Thiouracils hingewiesen werden (32–34). Ob das bisher nicht beobachtete quantitative Überwiegen der Tyrosine den physiologischen Verhältnissen entspricht und erst durch die Vollständigkeit der Extraktion und der verlustlosen Vorreinigung darstellbar wird, muß noch dahingestellt bleiben. Dabei

spielt zweifellos auch die Empfindlichkeit des Jodnachweises eine Rolle. Unbeantwortet bleibt aber die Frage des Nachweises relativ geringer Mengen von Jodthyroninen mit der chemischen Methode auf den gleichen Chromatogrammen.

Die Möglichkeit, daß die chemische Reaktion nicht alle anwesenden jodierten Substanzen auf den Chromatogrammen zur Darstellung brächte, veranlaßte die zweite Untersuchungsreihe. Hierbei wurden Seren von Patienten aufgearbeitet, die eine tracer-Dosis bis 50 μC erhalten hatten. Die Verteilung der chemischen Flecke entsprach den der anderen Chromatogramme. Die Radioaktivität konnte infolge der niedrigen Belegung nur im Bohrloch gemessen werden. Eine exakte Identität zwischen Farbflecken und Aktivitätszonen kann dabei nicht nachgewiesen werden. Trotzdem war deutlich erkennbar, daß sich die Aktivität unterschiedlich auf die einzelnen Fraktionen verteilte und daß in allen untersuchten Fällen Radioaktivität in der Zone der Jodthyronine nachweisbar war. Der Zweifel, ob diese Aktivität von den vermuteten Substanzen oder von jodierten Verunreinigungen herrührte, wurde in der dritten Untersuchungsgruppe durch Autoradiogramme geklärt. Hier konnte mit therapeutischen Radiojoddosen die Verteilung im Chromatogramm und die Beziehung zu den Standardflecken einwandfrei objektiviert werden.

Da es sich bei dieser Gruppe um hyperthyreote Patienten unter Behandlung handelte, können die Ergebnisse vielleicht nicht unbedingt mit der inhomogenen ersten Gruppe verglichen werden. Trotzdem kann gesagt werden, daß sich die chemischen Ergebnisse kaum von den diagnostischen Ergebnissen der zweiten Untersuchungsgruppe unterscheiden. Die Autoradiogramme bestätigten die Bohrlochmessungen von hyperthyreoten Patienten. Sie zeigten, daß die Radioaktivität vorwiegend in der T₄-Zone gespeichert wurde. Gleichzeitig wiesen die Aktivitätszonen eine auffällige Konkordanz der Formen mit denen der unbekannten Substanzen auf. Damit war ein zusätzlicher und wichtiger Nachweis des Jodgehaltes in den mit FFCA-Reagenz angefärbten Flecken geführt. Auch die autoradiographischen Flecke sprachen durch gute Begrenzung und nicht gestreckte Form für die Reinheit der isolierten Substanzen.

Aus den hier besprochenen Ergebnissen geht hervor, daß Jodtyrosine normalerweise im Blut vorkommen. Sie binden aber, aus noch nicht geklärten Gründen, sehr

wenig Radiojod und sind also durch die gewöhnlichen nucleonischen Techniken nicht darstellbar. Bei der hier beschriebenen Methode lassen sie sich chemisch direkt nachweisen. Die Jodthyronine sind dagegen, angeblich wegen ihrer niedrigen Blutkonzentration, chemisch nicht erfassbar, kommen aber durch radioaktive Isotope sehr gut zur Darstellung. Die Anwendung von Radiojod erscheint also unentbehrlich, um eine vollständige Darstellung aller zirkulierenden JPA zu erreichen. Es be-

steht die Möglichkeit, aus der hier beschriebenen kombinierten Extraktion und DC-Trennung, eine klinisch brauchbare Methode zu entwickeln, bei welcher bei niedriger Dosis von Radiojod in Kombination mit einem chemischen Jodnachweis eine vollständige Darstellung der Serum-JPA möglich ist.

Fräulein H. KERLER sind wir für hervorragende technische Hilfe und Fräulein E. KEIPER für die Hilfe am Manuskript zu Dank verpflichtet.

Literatur

1. TAUROG, A., I. L. CHAIKOFF und W. TONG, *J. biol. Chemistry* 184, 99 (1950). — 2. JOHNSON, H. W. und A. ALBERT, *Endocrinology* 48, 669 (1951). — 3. RANDALL, R. V. und A. ALBERT, *Endocrinology* 48, 327 (1951). — 4. BENUA, R. S. und B. M. DOBYNS, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 15, 118 (1955). — 5. WELLBY, M. L., *Austral. J. exp. Biol. med. Sci.* 40, 404 (1962). — 6. GEORGI, M. und K. E. SCHEER, in: *Radio-Isotope in der Endokrinologie*, S. 121. Hrsg. von G. Hoffmann, F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965). — 7. TREVOROW, W., *J. biol. Chemistry* 127, 737 (1936). — 8. TAUROG, A. und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 176, 639 (1948). — 9. STANBURY, J. B. und M. L. MORRIS, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 17, 1324 (1957). — 10. PITT-RIVERS, R., *N. Y. State J. Med.* 63, 43 (1963). — 11. WERNER, S. C. und I. RADICHEVICH, *Nature* (London) 197, 887 (1963). — 12. DUNN, J. T. und S. C. WERNER, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 24, 460 (1964). — 13. BÉRAUD, T., *Schweiz. med. J* 90, 1340 (1960). — 14. KLEIN, E., *Klin. Wschr.* 40, 3 (1962). — 15. STANBURY, J. B. und A. QUERIDO, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 16, 1522 (1956). — 16. KUSAKABE, T. und T. MIYAKE, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 24, 456 (1964). — 17. WERNER, S. C., V. V. ROW und I. RADICHEVICH, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 20, 1373 (1960). — 18. EMRICH, D., *Radio-Isotope in der Endokrinologie*, S. 145. Hrsg. von G. Hoffmann, F.K. Schatt-

aue-Verlag, Stuttgart (1965). — 19. WERNER, S. C. und R. J. BLOCK, *Nature* (London) 183, 406 (1959). — 20. BLOCK, R. J., S. C. WERNER, R. H. MANDL, V. V. ROW und I. RADICHEVICH, *Arch. Biochem. Biophysics* 88, 98 (1960). — 21. HOLLINGSWORTH, D. R., M. DILLARD und P. K. BONDY, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 62, 346 (1963). — 22. GRIES, G., K. H. PFEFFER und E. ZAPPI, *Klin. Wschr.* 43, 515 (1965). — 23. ZAPPI, E., *J. Chromatography*, z. veröff. — 24. GMELIN, R. und A. I. VIRTANEN, *Acta chem. Scand.* 13, 1469 (1959). — 25. BJÖRKSTEN, F., R. GRÄSBECK und B. A. LAMBERG, *Acta chem. Scand.* 15, 1165 (1961). — 26. WALDI, D., *Dünnschichtchromatographie*, S. 496. Hrsg. von E. Stahl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 27. ACLAND, D. J., *Nature* (London) 170, 32 (1952). — 28. STANLEY, P. G., *Nature* (London) 171, 933 (1953). — 29. ROCHE, J., R. MICHEL und E. VOLPERT, *C. R. Séances Soc. Biol.* 148, 21 (1954). — 30. OWEN, CH. A., B. F. MC KENZIE und A. L. ORWING, *J. Lab. und Clin. Med.* 47, 145 (1956). — 31. KENNEDY, T. H., *Nature* (London) 179, 50 (1957). — 32. TAUROG, A., G. D. POTTER und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 213, 119 (1955). — 33. TONG, W. und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 232, 939 (1958). — 34. MAN, E. B., *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 59, 528 (1962).

E. Zappi

1 Berlin 41, Rubensstraße 125

Bestimmung von Schilddrüsenhormonen im Serum mittels Gelfiltration und Ionenaustauscher

Von G. GYERTYÁNYFI und J. FÖLDES

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Budapest (Direktor: Prof. Dr. Imre Magyar)

(Eingegangen am 13. Januar 1967)

Es wird eine zur Trennung des Jodid-, Tyrosin- und Thyroningehaltes im Serum geeignete kombinierte Gelfiltration-Ionenaustauscher-Methode beschrieben. Die Vorteile des Verfahrens, seine Schwierigkeiten und die Ergebnisse der durchgeführten Tierversuche werden eingehend erörtert.

A combined gel filtration — ion exchange method is reported for the separation of the iodide, tyrosine and thyronine of serum. The advantages and difficulties of the method, and the results from an appropriate animal experiment are discussed in detail.

Bei den im Verlauf der Schilddrüsenfunktion in den Kreislauf gelangenden Hormonen handelt es sich um jodierte Aminosäuren. Außer diesen wird noch eine geringe Jodidmenge sezerniert. Im Plasma können diese Komponenten — wegen ihrer geringen Menge — nur mit schwerfälligen und zeitraubenden Methoden nachgewiesen und bestimmt werden. Die Anwendung von radioaktiven Isotopen erleichtert zwar die Isolierung, doch bestehen die Trennungsprobleme auch weiterhin. Zur Trennung dieser jodierten Aminosäuren benutzt man heute vorwiegend die papierchromatographische

Methode. Wird das Wanderungsmedium zweckentsprechend gewählt, so können wir die inaktiven Komponenten ebenso wie die radioaktiven separieren.

Beim Nachweis der Schilddrüsenhormone besteht die eigentliche Schwierigkeit in der Trennung der jodierten Aminosäuren vom Serum. Die hierbei angewendeten Manipulationen, wie Extraktion, Eindampfen, mehrmaliges Zentrifugieren, können zu hochgradiger Dejodierung führen, wodurch mitunter die Ergebnisse verfälscht werden. Viele Literaturangaben und eigene Erfahrungen deuten auf diese Tatsache hin (1—4). Um die